

A bioenergetikai profil vizsgálata ^{14}C -glükóz és ^{14}C -acetát oxidációjának összehasonlításával tumorsejtekben és tumoros szervezetben

Hujber Zoltán¹, Jeney András¹, Oláh Júlia¹, Szoboszlai Norbert², Baranyai Lajos³,
Környei József³, Petővári Gábor¹, Sebestyén Anna^{1,4}

¹Semmelweis Egyetem, I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet; ²Eötvös Loránd Tudományegyetem, Kémiai Intézet, Analitikai Kémiai Tanszék;
³Magyar Tudományos Akadémia Izotóp Zrt., ⁴Magyar Tudományos Akadémia – Semmelweis Egyetem, Molekuláris Onkológia Támogatott Kutatócsoport, Budapest

A tumorsejtek anyagcseréjét a változó mikrokörnyezeti tényezők mellett a tumornövekedést támogató genetikai mechanizmusok is befolyásolják. Napjainkban egyre nagyobb az igény a humán tumorok terápiás válaszreakcióinak vagy metabolikus profiljukra épülő szubtypusainak vizsgálatára. A tumorsejtek és a tumort hordozó gazdaszervezet metabolikus/bioenergetikai jellegének tájékozódó igényű tanulmányozására alkalmas módszernek tartható a ^{14}C -glükóz és ^{14}C -acetát oxidációjának vizsgálata. Munkánkban radioaktívan jelölt bioenergetikai szubsztrátokból felszabaduló CO_2 meghatározásával a tumorsejtek (in vitro sejtvonalak, illetve primer humán lymphocyták és leukaemiasejtek) és a tumoros szervezet (SCID, C57Bl/6) metabolikus aktivitását vizsgáltuk in vitro és in vivo. Megállapítottuk, hogy a szolid tumorból származó tumorsejtek többsége fokozottabban oxidálja a glükózt, mint az acetátot, míg a vérből izolált AML-, CML- és CLL-sejtek az acetátot oxidálták nagyobb mértékben, mint a glükózt in vitro. In vivo vizsgálatainkban azt tapasztaltuk, hogy a bioenergetikai szubsztrátok intravénás vagy per os adagolásakor kimutatható a tumorok hatása a gazdaszervezet glükóz-, illetve acetátoxidációjára. Első adatot szolgáltatunk az emberi tumort hordozó gazdaszervezetek metabolikus profiljának változásáról xenograft modellen. Összefoglalva, eredményeink szerint több bioenergetikai szubsztrát oxidációjának összehasonlítása informatív módszer lehet a tumorsejtek in vitro, illetve a tumorok és a gazdaszervezet in vivo metabolikus profiljának vizsgálatában. Magyar Onkológia 59:292–301, 2015

Kulcsszavak: metabolikus profil, ^{14}C -jelölt energiaszubsztrát, glükózoxidáció, acetátoxidáció, onkometabolit

Tumour cell metabolism can be influenced by alterations of the extracellular microenvironment and the tumour-promoting genetically changed mechanisms. There is increasing interest to introduce appropriate bioenergetic assays to describe the therapeutic effect and metabolic subtypes of tumours in clinical oncology. The analysis of ^{14}C -glucose and ^{14}C -acetate oxidation could be a suitable method to examine the metabolic/bioenergetic profiles of tumour cells and tumorous host organisms. The metabolic activity of tumour cells (in vitro cell lines, primary human lymphocytes and leukaemia cells) and the tumorous host organism were examined in vitro and in vivo by detecting the released CO_2 levels derived from the radioactive carbon atom labelled energy substrates. We have found that the most cancer cells of solid tumours oxidised glucose more intensively than acetate. It was interesting that AML, CML and CLL cells isolated from blood preferred acetate as an energy substrate in vitro. Furthermore, based on our observations, tumours affected the glucose or acetate oxidation of the organism when applying bioenergetic substrates per os or iv.. We provided

Levelezési cím: Dr. Sebestyén Anna; Semmelweis Egyetem I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet,
1085 Budapest, Üllői út 26.; tel.: +36-12661638/54447, e-mail: anna@korp1.sote.hu

Közlésre érkezett: 2015. június 19. • Elfogadva: 2015. július 30.

the first data about the alterations in metabolic profiles of the tumour bearing organism in xenograft models. In summary, according to our results, comparison of the energy substrate oxidation can be an indicative method related to the metabolic profile analysis of tumour cells in vitro and tumorous host organism in vivo.

Hujber Z, Jeney A, Oláh J, Szoboszlai N, Baranyai L, Környei J, Petővári G, Sebestyén A. Measuring ^{14}C -glucose and ^{14}C -acetate oxidation in tumour cells and tumorous host organism. Hungarian Oncology 59:292–301, 2015

Keywords: metabolic profile, ^{14}C -labelled energy substrate, glucose oxidation, acetate oxidation, oncometabolite

BEVEZETÉS – A METABOLIKUS PROFIL VIZSGÁLATÁNAK IGÉNYE

A tumorsejtek és a tumoros, tumort hordozó szervezet anyagcsere-folyamatainak, metabolizmusának, az energiaszubsztátok átalakulásának tanulmányozása napjainkban ismét az onkológiai kutatások érdeklődési körébe került (1, 2).

Otto Warburg már a XX. század első harmadában megfogalmazta hipotézisét, amely szerint a sejtlégzés nem megfelelő működése mellett, a glikolitikus fenotípus – metabolikus változások következményeként – segíti a sejtek környezeti alkalmazkodását, támogatja a tumorprogressziót (1). Az elmúlt évtizedben lezajlott bioenergetikai vizsgálatok eredményei megerősítve és pontosítva az előbbieket felhívják a figyelmet arra, hogy a különböző típusú daganatokra, de azon belül az egyes tumorokra is, más-más energetikai szubsztát preferencia (pl. glükóz, glutamin, laktát, acetát stb.) lehet jellemző (3). Egy másik rendkívül érdekes kérdés, hogy adott tumorsejt-populációban a környezeti hatások szelekciós nyomása mellett azoknak a daganatsejteknek vannak a legjobb túlélési esélyei, proliferációs kapacitása, amelyek az anyagcsere-útvonalak felhasználását a leggyorsabban tudják optimalizálni, újraprogramozni (metabolic shift or reprogramming) vagy más mechanizmussal új, megfelelőbb környezetbe képesek kerülni (4).

A tumorsejtek anyagcseréjét genetikai mechanizmusok és mikrokörnyezeti tényezők együttesen határozzák meg, előbbiek nagy alkalmazkodóképességgel ruházzák fel a tumorsejteket a tumorprogresszió változó körülményei között (3, 5). A tumorsejtek vizsgálatának egyik módja különböző primer (szövetekből izolált tumorsejtek) vagy tumoros sejtvonalak funkcionális vagy biokémiai vizsgálata *in vitro* tenyésztést követően (ez azonos körülményeket biztosít a sejtek számára, így pl. elsősorban genetikai tényezők érvényesülhetnek az anyagcsere szabályozásában is, bár természetesen sosem szabad elfelejteni, hogy ezek bizonyos korlátok között végzett modellkísérletek). A humán tumorsejtvonalak bioenergetikai szubsztát oxidációjának vizsgálata esetén a glükóz oxidációja a glikolízisben és az oxidatív foszforilációban egyaránt történhet, ugyanak-

kor az acetát túlnyomóan a mitokondriumban az oxidatív foszforiláció során alakul át szén-dioxiddá.

A legújabb géntechnológiai és tömegspektroszkópiai mérőmódszerek lehetőséget teremtettek a génmutációk és a metabolikus változások közötti kapcsolatok feltárására. Ilyen például az elmúlt években a különböző mitokondriális enzimek génhibáinak, génmutációinak következtében felhalmozódó metabolitok tumorprogresszióban egyre jobban ismertté, elismertté váló szerepe (6–8). Ismert, hogy a tumorsejtekben gyakran jellemző az intenzív glikolízis és a megváltozott, károsodott mitokondriális működés. Ezzel összefüggésben kimutatták például, hogy egyes metabolitok (szukcinát, fumarát) nagy mennyiségű (8, 9), míg mások, pl. a 2-hidroxiglutarát, szerkezeti eltérés miatt onkometabolitnak tekinthetők (10, 11). Az onkometabolit kifejezés használata az évtized elején jelent meg az irodalomban. Az onkometabolitok olyan, az anyagcsere-folyamatokban (pl. glikolízis, citrátciklus stb.) normálisan is megjelenő kis molekulák, amelyeknek kóros mennyiségi vagy szerkezeti változásai az anyagcsere-folyamatok szabályozásának megváltozását segítik elő, és ezen keresztül járulnak hozzá a daganatsejtek túléléséhez, proliferációjához, a tumorprogresszióhoz (12). Az elmúlt időszak technikai fejlődésének következtében megismert tumorbiológiai eredmények is hozzájárultak a funkcionális genomikai szemlélet onkológiai elterjedéséhez. Mindezek nemcsak tumorbiológiai ismereteinket gazdagítják, hanem alapvetően új irányt hoztak a gyógyszertervezésben (pl. szintetikus letalitás) (13), továbbá rámutattak a tumorok genetikai és metabolikus szabályozásának bonyolultságára, túlbiztosítottságára. A bonyolult szabályozási lehetőségek segítik a tumorsejtek gyors alkalmazkodóképességét, ami jelentősen korlátozhatja a jelenlegi terápiás beavatkozások hatékonyságát (rezisztenciaproblémák). A jelenlegi alapkutatói eredmények várhatóan hasznosulnak a nem túl távoli klinikai onkológiai gyakorlatban, ezért fel kell készülni azok befogadására, újabb terápiás célpontok azonosítására. Kétségtelen, hogy a humán tumorok hormon-receptor-státusztól függő terápiás válaszreakcióinak vagy metabolikus profiljukra épülő szubtypusainak felismerése

a gyógyszerfejlesztések, illetve a terápiás választások során a mutációsprofil-vizsgálatokhoz hasonlóan a metabolikus profil meghatározásának igényét fogalmazhatják meg a jövőben (2, 14, 15).

Mindehhez szükség lehet az adott tumor malignus genotípusa által irányított metabolikus profil kimutatására alkalmas vizsgálati rendszerekre, lehetőség szerint olyanokra, amelyek az onkológiai intézmények széles körében elérhetőek. A metabolikus vizsgálatok igénye ugyan kielégíthető lenne több nagy teljesítményű metabolitanalizátorral (pl. tömegspektroszkópiához kapcsolt folyadékkromatográfia – LC-MS, NMR), de ezek széles körű elterjedése a klinikai rutindiagnosztikában a műszerek magas költsége miatt nem várható a közeljövőben. Törekedni kell olyan költséghatékony módszer kialakítására, amely a terápiában hasznosítható tájékoztatást szolgáltat a tumorsejtek metabolikus profiljáról, illetve szükség szerint a tumoros beteg metabolikus állapotáról.

Korábbi vizsgálatainkban megfigyeltük, hogy a glükóz és az acetát, mint bioenergetikai szubsztrátok metabolizmusának összehasonlításával kimutatható a tumorsejtek domináns bioenergetikai mechanizmusa, pl. a glikolízis vagy az oxidatív foszforiláció. Több mérőmódszer egyidejű alkalmazásakor (^{13}C -stabil izotóp technika, ATP-koncentráció mérése, metabolikus enzimek génexpressziós vizsgálata) levonható következtetések megegyeztek a glükóz és az acetát oxidációjának vizsgálati eredményével. Ez a vizsgálat megerősítette azt a felvetést, miszerint legalább két bioenergetikai szubsztrátból (glükóz, acetát, glutamát, tejsav) felszabaduló szén-dioxid (CO_2) mennyiségének összehasonlítása alkalmas a tumorok metabolikus profiljának első vonalbeli megállapítására *in vitro* (1. ábra). Ezt a felvetést kívánja alátámasztani a jelenlegi vizsgálat is, amely bemutatja a glükóz és az acetát oxidációjából származó szén-dioxid meghatározásával szerzett tapasztalatokat többféle tumorsejtben *in vitro*, valamint a tumort hordozó kísérleti állatokban *in vivo* (16–18).

VIZSGÁLATI ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Radioaktív vegyületek

A vizsgálatainkhoz alkalmazott [^{14}C]-Na-acetát [fajlagos aktivitás: 57 mCi/mmol], [^{14}C]-glükóz [fajlagos aktivitás: 55 mCi/mmol] az MTA Izotóp Intézet Zrt. terméke, amelyet vizsgálataink számára rendelkezésünkre bocsátott.

Tumorsejtvonalak

Az emberi vagy rágcsálótumorokból származó sejtvonalakat (HT25 vastagbél-adenocarcinoma, HT1080 fibrosarcoma (humán); Osort osteosarcoma (humán); MDA-MB-231, BT-474, ZR-75.1 emlőcarcinomák (humán); HepG2

hepatocellularis carcinoma (humán); U937 monocytás leukaemia (humán); A2058 melanoma (humán); LLT-HH tüdőcarcinoma (egér); colon 38 coloncarcinoma (egér) intézetünk szövettényészeti laboratóriuma a Nemzetközi Sejtbank (ATCC, ECACC) adatlapoknak megfelelő médiumokban tartotta fenn és biztosította vizsgálatainkhoz. A szövettényészeti edényeket, tápfolyadékokat, főtális borjúsavót a Sigma-Aldrich Zrt.-től vásároltuk.

A humán vérképző rendszer malignus sejteinek, illetve a normális sejtek Ficoll-gradienssel történő szeparálásához az ETT TUKEB engedélyével (22-104-/007-118EKU) Dr. Fekete Sándor (Szent László Kórház) szolgáltatta a perifériásvér-mintákat, a diagnózishoz a patológiai vizsgálatot intézetünk hematopatológia-laboratóriuma végezte el.

Kísérleti állatok

C57Bl/6 testvérpároztatású, 18–22 g testtömegű, mindkét nemű egeret használtunk a nem humán, hanem egér eredetű tumorok *in vivo* vizsgálataiban. A colon 38 és LLT-HH egér colon-, illetve tüdő-adenocarcinomát C57Bl/6 egerek lépébe, illetve hátuk bőre alá is oltottuk a különböző graftok kialakítása érdekében. A humán eredetű A2058 melanoma, az Osort osteosarcoma, a HT25 vastagbél-adenocarcinoma és a HT1080 fibrosarcoma sejtenyésztéséből 2×10^6 tumorsejtet subcutan oltottunk SCID (szisztémásan immunszupprimált, patogénmentes sátorban, testvérpároztatással szaporított beltenyésztett, 16–21 g testtömegű, mindkét nemű) egerekbe. A kísérleti állatok tartása és kísérletbe vonása a Semmelweis Egyetem engedélyezési eljárása alapján az állattartási és kísérleti előírások betartása mellett történt. Az egerek a szabvány szerinti tápot és csapvizet fogyasztottak. A kísérleti állatokat állandó hőmérséklet és nedvességtartalom, valamint 12 órai fény/sötétség napi váltakozást biztosító feltételek mellett tartottuk.

A tumorsejtek *in vitro* acetát- és glükózhasznosításának vizsgálata

5% főtális borjúsavót tartalmazó tápfolyadékban szaporodó humán tumorsejtenyésztésből 10^6 sejtet adtunk 5 ml – glükóz-, piruvát- és glutaminmentes (D5030, Sigma) – tápfolyadékba, majd tenyésztőedénybe helyeztük. Ezt követően a tumorsejtekhez 1 μCi [^{14}C]-Na-acetátot vagy [^{14}C]-glükózt adtunk. Ezután a légzési CO_2 radioaktivitását a következő módon határoztuk meg: Az áramlási kamrában azonos légköri nyomással áthaladó CO_2 -mentes levegő a sejtek, illetve az egerek (ld. később) által kilelegzett CO_2 -t a kamra falához illesztett alacsonyabb nyomású gyűjtőkamrába irányította, ahol a gyűjtőkamrába helyezett alkalikus filter kártya (MTA Izotóp Intézet Zrt. biztosította) felfogta. A tumorsejtek vizsgálatakor az egyórás inkubációs idő letelével a tápfolyadékban maradt CO_2 -t citromsavval 60 °C-on

további inkubálással szabadítottuk fel, és szintén megkötöttük az alkalikus kártyán. A kártya radioaktivitását, a beütések számát egy ikercsatornás Geiger–Müller-számlálón határoztuk meg.

A tumort hordozó egerek szubsztrátfelhasználásának vizsgálata in vivo

Az átlagosan 20–21 g testtömegű egereket 18 h táplálékmegevonást követően használtuk a radioaktív szubsztrátok oxidációjának vizsgálatához, az állatok 0,2 μCi [^{14}C]-Na-acetátot vagy [^{14}C]-glükózt kaptak intravénás injekcióval vagy *per os*. Ezt követően az egyes egereket behelyeztük az áramlási kamrába. Az egerek által kilélegzett CO_2 -t a radioaktív jelzés egyes időtartományaiban (1–60, 61–120 és 121–180 perc) az *in vitro* vizsgálathoz hasonlóan gyűjtöttük össze, majd mértük a radioaktivitását. Bizonyos vizsgálatokban intraperitoneálisan inzultint (0,5 NE/kg), illetve *per os* jelöletlen glükózt (20%-os glükózoldat formájában 100 mg/kg dózisban) adtunk az állatoknak a szubsztrátok adása előtt 15 perccel.

Metabolitok koncentrációmérése stabil izotópos jelölési technikával LC-MS-sel

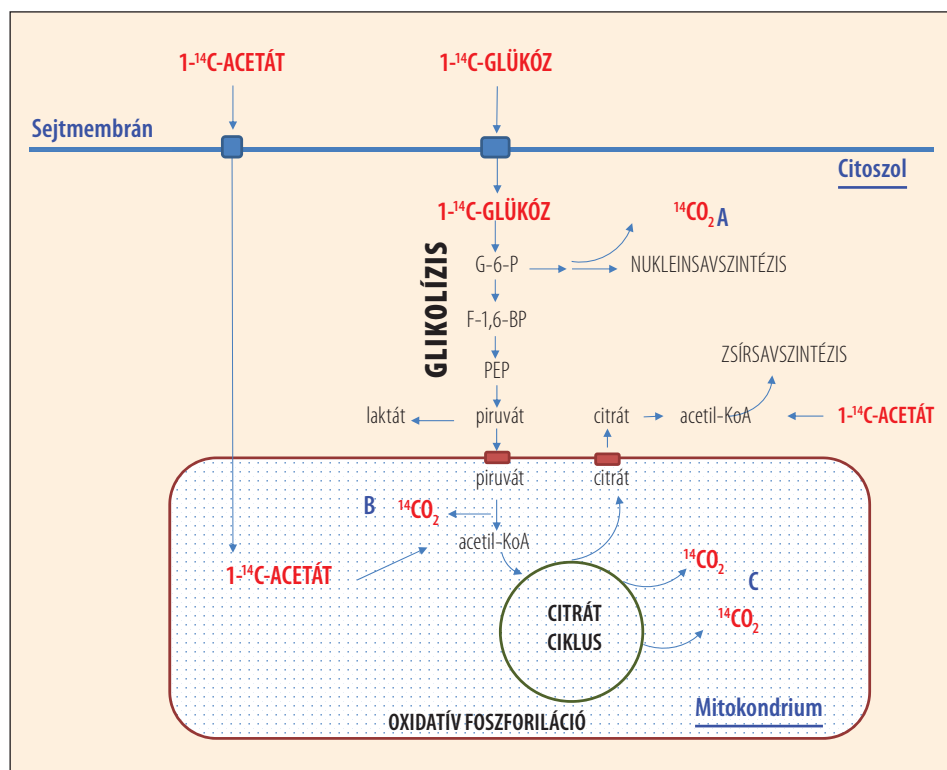
A HT1080 és ZR-75.1 sejtek metabolikus jellemzéséhez 3 millió sejtet a jelölés előtt D5030 (Sigma-Aldrich) táptalajba helyeztünk, majd stabil [^{13}C]-glükózt vagy [^{13}C]-Na-acetátot (10 mM koncentráció, Sigma-Aldrich) adtunk hozzá. 1 órás inkubációs idő után a sejteket folyékony N_2 -nel fagyasztottuk, majd metanol-kloroform-víz elegyével extraháltuk a meghatározni kívánt metabolitokat (glikolízis, pentóz-foszfát-út és Szentgyörgyi–Krebs-ciklus intermedierek), amelyeket a mérésig -70°C -on tároltunk. A meghatározandó vegyületek (pl. glükóz 6-foszfát, malát, citrát, szukcinát, laktát – Sigma-Aldrich) standard oldatsorait is használtuk. Az LC-MS analízist az MTA TTK Tömegspektrometria

Osztályán végeztük. Az LC-MS mérést grafitoszlopos (Thermo Hypercarb) Waters folyadékkromatográffal végeztük, eluensként metanol, víz oldatát alkalmaztuk hangerővel. Az MS-detektálás Waters Quattro Micro késszűléssel történt, negatív ESI ionforrás, tripla kvadrupól analízissel (19).

EREDMÉNYEK

A tumorsejtek esetében a glükóz oxidációja a glikolízisben és a mitokondriumban (citromsavciklus, oxidatív foszforiláció) egyaránt történhet, ugyanakkor az acetátból elsősorban a mitokondriális oxidációban keletkezik CO_2 (1. ábra). Vizsgálatainkban megállapíthattuk, hogy az egészséges és a tumorsejtek egyaránt változó módon részesítik előnyben a glükóz vagy az acetát hasznosítását a sejtlegzésben. Nem zárható ki az azonos hisztogenetikai csoportba tartozó sej-

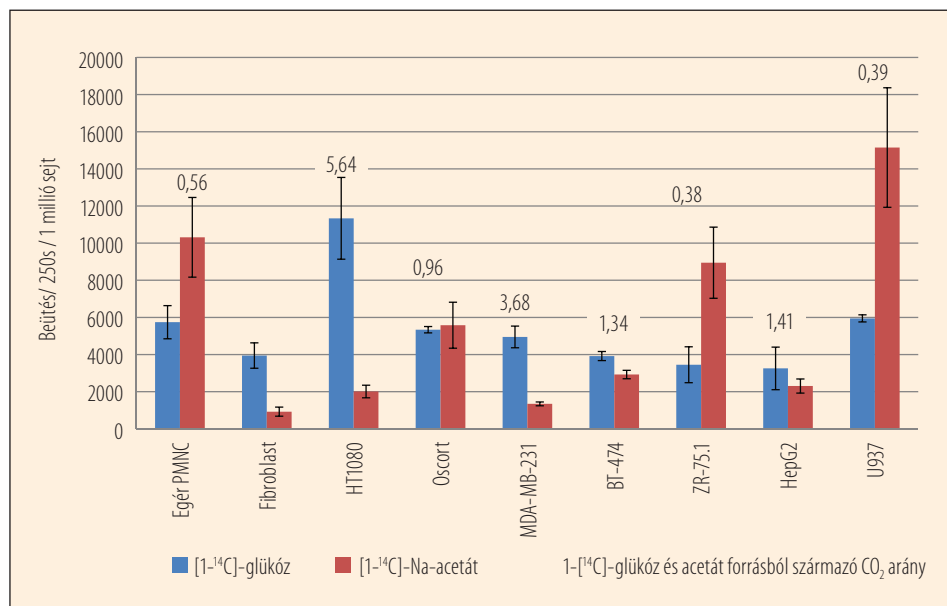
1. ábra. A CO_2 -képződés főbb lehetőségei ^{14}C -jelzett glükóz és acetát energetikai szubsztrátokból (egyszerűsített ábrázolás). A ^{14}C -jelölt szubsztrátokból a bioenergetikai folyamatokban ^{14}C -jelölt CO_2 keletkezhet, amit detektálni lehet radioaktivitása alapján. A ^{14}C -jelzett glükóz és acetát bioenergetikai szubsztrát sorsa: oxidáció a glikolízis, citrátciklus és oxidatív foszforiláció folyamatában. A CO_2 képződésének főbb lehetőségei: (A) glükóz-6-foszfát (G-6-P) direkt oxidációjából a pentóz-foszfát-úton a 6-foszfoglükonát-dehidrogenáz enzim katalízisével; (B) a piruvát acetil-koenzim-A-vá (acetil-KoA) alakulása során a piruvát-dehidrogenáz enzimkomplex segítségével; (C) a citromsavciklusban az izocitrát-dehidrogenáz és az alfa-ketoglutarát-dehidrogenáz reakciójában (F-1,6-BP: fruktóz-1,6-biszfoszfát)



tek hasonló bioenergetikai szubsztráthasznosítási profilja. Adataink szerint az egészséges fibroblast és a humán fibrosarcoma, valamint az izolált perifériás mononukleáris sejtek és a vizsgált leukaemia-sejtek azonos bioenergetikai szubsztrátot részesítettek előnyben, az eltérő szubtypusú különböző emlőcarcinoma-sejtvonalak viszont egyedi különbségeket mutattak. Az általunk vizsgált tumorsejtvonalak nagyobb része a glükózt oxidálta nagyobb kapacitással, mint az acetátot (a 7 vizsgált tumorsejtvonal közül csak kettő oxidálta szignifikánsan nagyobb mértékben az acetátot). Figyelemre méltónak tartható azonban, hogy a 7 különböző tumorsejtvonal glükózoxidáló képessége kisebb egyedi változatosságot mutatott, míg jelentősebb eltérést lehetett tapasztalni az acetát oxidációjának a vizsgálatokor (~700–15 000 beütés/250 sec/10⁶ sejt) (2. ábra). Ebből feltételezhető, hogy a glükóz/acetát oxidáció hányadosában mutatkozó, a sejtvonalakat jellemző különbségektől elsősorban a tumorsejtek eltérő acetáthasznosítása, ezen keresztül a mitokondriális működés változása tehető felelőssé.

A bioenergetikai mechanizmusok klinikai anyagban történő vizsgálatát a humán vérből készült sejteinek rövid idejű túlélő sejtenyésztéseiben (short-term culture) is alkalmunk volt tesztelni. Megfigyeltük, hogy mind az egészséges perifériás mononukleáris sejtek, mind a granulocyták glükózoxidációja nagyobb mértékű volt a mért radioaktív CO₂ alapján, mint amit perifériás vérből Ficoll-gradiens szeparált krónikus lymphoid leukaemia (CLL), valamint izolált akut myeloid leukaemia (AML) sejtek esetében detektáltunk. A malignus lymphocytá, CLL-populációban az acetát oxidációja is szignifikánsan megváltozott értéket mutatott (emelkedett), míg az AML-sejtek esetében csak a glükóz oxidációja mutatott csökkenést. További érdekes megfigyelés, hogy a rossz prognózisú CML-es esetekben a terápiás beavatkozást követően megjelenő rezisztens CML-sejtekben mind a glükóz, mind az acetát oxidációja közel kétszeresére emelkedett a gyógyszeresen korábban nem kezelt CML-sejtekéhez képest. A változások értékelé-

2. ábra. Humán és egér eredetű sejtvonalak, izolált normális humán sejtek CO₂-termelése [1-¹⁴C]-jelzett glükózból és Na-acetátból *in vitro* (átlag±SD). HT1080, fibrosarcoma (humán); Oscort, osteosarcoma (humán); MDA-MB-231, BT-474, ZR-75.1, emlőcarcinomák (humán); HepG2, hepatocellularis carcinoma (humán); U937, monocytás leukaemia (humán); Egér PMNC: egerből származó perifériás mononukleáris sejt; Fibroblast: humán fibroblast. A jelölt glükózból és acetátból származó CO₂-termeléssel arányos beütéserősségek hányadosát is feltüntettük



sénél azonban figyelembe kell venni, hogy a vizsgált bioenergetikai szubsztrátok, különösen a glükóz bioszintetikus folyamatokban is részt vehet, és ez a sejtlegzésben való részvételük csökkenésével is együtt járhat (1. táblázat).

A bioenergetikai mechanizmusok nem kizárólag a tumorsejtekben, hanem a tumorprogresszió során egyre meghatározóbban az egész szervezetben is jelentős szerepet játszanak. Az anabolikus és katabolikus mechanizmusok közötti egyensúly felborulása mentén a tumorprogresszió terminális szakaszában a gazdaszervezet szintjén „energetikai katasztrófa” következhet be. Ennek a patomechanizmusnak a vizsgálatára adhat lehetőséget a bioenergetikai szubsztrátok oxidációjának meghatározása kísérleti állatokban. Vizsgálatainkban azt tapasztaltuk, hogy a glükóz és az acetát oxidációja a szervezetben nagy eltérést mutat *per os*, valamint intravénás alkalmazás esetén. Egészséges (nem tumoros) egerek esetében megfigyelhető, hogy a glükózból képződött szén-dioxid mennyisége intravénás alkalmazáskor szignifikánsan magasabb, akár háromszorosa az orális adagolás esetén kapott értéknek, míg az acetát oxidáció következményeként kimutatható jelölt CO₂ nagy mennyisége jellemzi a *per os* adagolást (2. táblázat). Ez a különbség a gasztrointesztinális szervek lokális, a perifériás érrendszerhez tartozó területek szerveihez képest

fokozottabb acetátoxidációs kapacitása, az acetát jobb hasznosulása miatt alakulhat ki. Megfigyelhető az is, hogy LLT-HH kísérleti tumor jelenlétében az intravénásan bejuttatott energiaszubsztrátok esetében a glükózból származó légzési CO₂ mennyisége a tumoros állatokban csökkent, míg a *per os* adagolás esetében az acetát oxidációja mutatott csök-

kenést és a glükóz hasznosulása kismértékű emelkedést (2. és 3. táblázat) a szervezet szintjén. A glükózanyagcsere szabályozásának változásai az élő szervezetben több szervet érinthetnek és időben ciklikus változást mutathatnak, ezért a glükózból képződött szén-dioxid mennyiségét a ¹⁴C-jelzett glükóz adását követő első, második és harmadik órában is összehasonlítottuk egészséges és tumoros állatokban. *Per os* jelzett glükóz adagolása esetén az 1. és 2. órában a glükózból képződött CO₂ az egészséges állatokban közel azonos mértéket mutatott, majd a harmadik órára csökkent. A tumoros állatok esetében viszont azt tapasztaltuk, hogy a 2. órában a jelölt CO₂ mennyisége tovább emelkedik és csak a harmadik órában esik vissza (3. táblázat). Érdekes továbbá, hogy az acetátból képződő CO₂ mennyisége már a 2. órában drámaian csökken.

A tumoros szervezet anyagcsere-változását (megváltozott szubsztrát-hasznosítást) mindkét egértumor-sejt-modell esetében tapasztaltuk, a kilégzett jelölt CO₂ mennyiségének változásában markánsabb eltérést a *per os* acetátoxidáció jelentős csökkenésében láttunk a vizsgált egerekben. Eredményeink alapján további vizsgálatokban az adott tumorok *in vitro* metabolikus jellemzésének összehasonlításával érdemes lenne ezt az egyszerű módszert és esetleges felhasználhatóságát tovább vizsgálni. Meghatározni, hogy alkalmas-e adott tumorok jelenlétében a szervezet cukor-, illetve acetáthasznosító képessége változásának kimutatására, ezen keresztül akár a daganatsejtek progresszió során bekövetkező metabolikusprofil-változásának kimutatására is.

Előbbiek megfontolását alátámasztják további eredményeink is. Megfigyeltük, hogy a tumoros egerekben az acetátoxidáció csökkenése 100 mg/kg glükóz hozzáadása mellett elmaradt (20 547±4450 beütés/250 sec/egér maradt), valamint hogy a tumorral transzplantált kísérleti állatoknak csak egy részében

1. táblázat. Lymphoid és myeloid eredetű humán leukaemiasejtek ¹⁴C-jelzett CO₂-termelése [¹⁻¹⁴C]-glükózból és [¹⁻¹⁴C]-Na-acetátból *in vitro*

Sejttenyészetek	[¹⁻¹⁴ C]-glükózból (A) vagy [¹⁻¹⁴ C]-Na-acetátból (B) keletkezett CO ₂ radioaktivitása			
	CO ₂ -radioaktivitás (beütés/250 sec/10 ⁶ sejt, átlag±SD)			
	[¹⁻¹⁴ C]-glükóz (A)	[¹⁻¹⁴ C]-Na acetát (B)	A + B	A/B
PMNC (egészséges személyekből)	1444±600	1520±638	2964	0,95
CLL	457±195	3220±2410	3677	0,14
Granulocyták (egészséges személyekből)	1727±879	810±147	2537	2,13
AML	869±218	978±188	1847	0,89
CML kezelés előtt	1253±456	1031±825	2284	1,22
CML kezelés után	2449±1362	2334±1284	4783	1,05

[¹⁻¹⁴C]-glükóz és [¹⁻¹⁴C]-Na-acetát 1 µCi/egér, minden egyes csoportban legalább 7 független eset adatait összegeztük

2. táblázat. *Per os* vagy intravénásan adagolt glükóz és acetát oxidációja egészséges (nem tumoros) és tumoros C57Bl/6 egerekben

Beütés/250 sec, átlag±SD				
Adagolás módja		[¹⁻¹⁴ C]-glükóz (A)	[¹⁻¹⁴ C]-Na-acetát (B)	A/B
Intravénás	egészséges	16 604±1228	3400±269	4,88
	LLT-HH	8528±2490	3832±236	2,23
<i>Per os</i>	egészséges	5058±1504	21 661±4435	0,23
	LLT-HH	6670±461	11 258±6844	0,59

[¹⁻¹⁴C]-glükóz és [¹⁻¹⁴C]-Na-acetát *per os* vagy *iv.* adagolás 0,2 µCi/egér

3. táblázat. A [¹⁻¹⁴C]-glükóz és [¹⁻¹⁴C]-Na-acetát oxidációjának időbeli változása egészséges (nem tumoros) és colon 38 vagy LLT-HH tumort hordozó C57Bl/6 egerekben

Energetikai szubsztrát	Kísérleti állat	CO ₂ -radioaktivitás (beütés/250 sec, átlag±SD)		
		1–60. perc	61–120. perc	121–180. perc
[¹⁻¹⁴ C]-glükóz	egészséges	5058±1504	5655±1614	2560±1147
	colon 38	6270±1230	10 822±3726	3671±429
	LLT-HH	6670±461	8507±1125	n.a.
[¹⁻¹⁴ C]-Na-acetát	egészséges	21 661±4435	595±183	409±75
	colon 38	13 309±3809	336±96	61±79
	LLT-HH	11 258±6844	n.a.	n.a.

[¹⁻¹⁴C]-glükóz és [¹⁻¹⁴C]-Na-acetát *per os* adagolás 0,2 µCi/egér, n. a.: nincs adat

4. táblázat. Az inzulin hatása a $[1-^{14}\text{C}]$ -glükóz *per os* adagolásakor képződött és kilélegzett radioaktív szén-dioxid mennyiségére

Egészséges (nem tumoros) C57Bl/6 vagy SCID egerek, illetve tumoros párjaik	Radioaktivitás (beütés/250 sec/egér, átlag \pm SD)		
	$[1-^{14}\text{C}]$ -glükóz	Inzulinadás után $[1-^{14}\text{C}]$ -glükóz	
	1–60. perc	1–60. perc	61–120. perc
C57Bl/6 kontroll	5058 \pm 1504	7530 \pm 713	3800 \pm 722
LLT-HH (C57Bl/6)	6670 \pm 461	3874 \pm 877	3397 \pm 256
SCID kontroll	1264 \pm 453	5777 \pm 495	2838 \pm 338
A2058 melanoma (SCID)	2985 \pm 184	8978 \pm 2567	7069 \pm 1435
Oscort osteosarcoma (SCID)	2567 \pm 390	9485 \pm 1374	5168 \pm 1976

$[1-^{14}\text{C}]$ -glükóz és $[1-^{14}\text{C}]$ -Na-acetát *per os* adagolás 0,2 μCi /egér

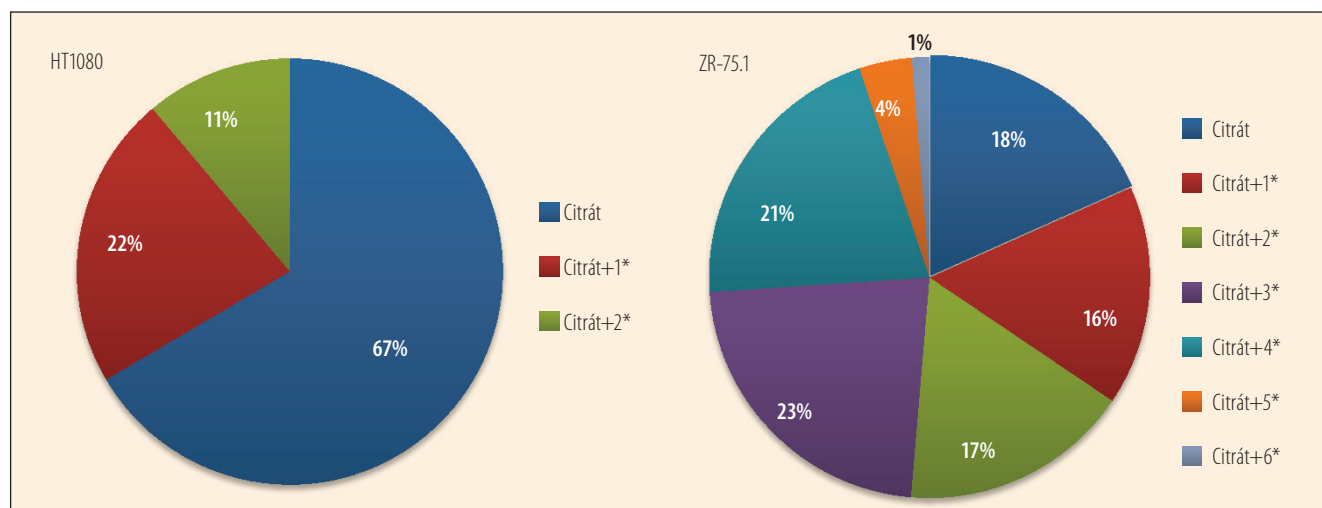
– feltehetően a transzplantált tumortól és gazdaszervezettől (C57Bl/6 vagy SCID) is függően – figyeltük meg az inzulin-indukált glükózoxidáció fokozódását vagy hiányát, amely időben különböző sebességgel rendeződik a szervezet szintjén (4. táblázat).

A jelen tanulmányban megállapíthattuk, hogy a humán tumorsejtek egyértelműen megváltoztatják a gazdaszervezet bioenergetikai profilját, azonban az nem feltétlenül lesz azonos a tumorsejtek saját metabolikus profiljával. A vizsgált különböző típusú tumorgraftok esetében egyértelmű különbségeket lehetett megfigyelni a különböző tumorsejtekkel transzplantált egerek szubsztrátoxidációs kapacitásában (4., 5. táblázat). Az A2058 melanomával és a HT25 colonicarcinomával xenotranszplantált ege-

rek esetében az acetátfelhasználás nem változott, de a glükózoxidáció szignifikánsan fokozódott (a HT25 esetében a glükózoxidációs adatokat nem adtuk meg a táblázatban), és az A2058 esetében még inzulin adásakor is szignifikánsan magasabb volt a glükózoxidáció mértéke. A HT1080 fibrosarcoma és Oscort osteosarcoma xenograftot hordozó egerekben ezzel ellentétben az acetát oxidációja fokozódott szignifikáns mértékben. A HT1080 sejtek esetében ez különösen érdekes, mert ennek a sejtnak az általunk

más technikákkal jellemzett *in vitro* metabolikus profilja egyértelműen alátámasztja, hogy elsősorban a glükózt használják energiaszubsztrátként *in vitro*. Stabil izotópjelölt glükóz vagy acetát hozzáadását követően az elvégzett LC-MS metabolitmennyiségi vizsgálatok, a ^{13}C -laktát/ ^{13}C -malát és ^{13}C -glükóz-6-foszfát/ ^{13}C -malát arányok mutatták a HT1080 sejtekben *in vitro* intenzíven működő glikolízist és csökkent aktivitású citrátciklust (az adatokat részletesen nem mutatjuk be). Ezzel szemben a ZR-75.1 emlőcarcinoma-sejtek nagyobb mennyiségben termeltek citrátkör-intermediereket, az acetátoxidáció mértéke jelentősnek bizonyult. $[2-^{13}\text{C}]$ -Na-acetát jelölés után meghatároztuk a citrátba épült ^{13}C -atomok számát is, a HT1080 sejtekben a citrátmaximum 1 és 2 jelölt ^{13}C -atomot tartal-

3. ábra. A $[2-^{13}\text{C}]$ -jelölt acetát szubsztrátból a ^{13}C -szénatomok citrátba épülésének eltérései a HT1080 és ZR-75.1 tumorsejtekben. A $[2-^{13}\text{C}]$ -jelölés után a HT1080 sejtek esetében ugyanannyi idő alatt (60 perc) a hat szénatomos citrátba maximum 1, illetve 2 ^{13}C -atom épült be, míg a ZR-75.1 sejtek metabolitanalízisekor 1, 2, 3, 4, 5 és 6 ^{13}C -atomos beépülést is megfigyeltünk. A teljes (jelölt+jelöletlen) citrátpoolban a különböző mértékben jelölődő citrát százalékos eloszlását tüntettük fel a HT1080 és ZR-75.1 sejtek esetében



5. táblázat. [^{14}C]-Na-acetátból képződő szén-dioxid humán tumort nem hordozó és hordozó SCID egerekben *per os* adagolás esetén

Egészséges (nem tumoros)/ tumoros SCID egér	Radioaktivitás beütés/250 sec/ egér, átlag \pm SD
	[^{14}C]-Na-acetát jelölés 1–60. perc
Egészséges SCID	19 916 \pm 1690
A2058 melanoma	20 908 \pm 357
Oscort oteosarcoma	25 118 \pm 2702
HT25 colon-adenocarcinoma	19 738 \pm 3168
HT1080 fibrosarcoma	30 320 \pm 3184

[^{14}C]-glükóz és [^{14}C]-Na-acetát *per os* adagolás 0,2 μCi /egér

mazott, míg a ZR-75.1 sejtekben 6 szénatomjelölést tartalmazó citrátot is detektáltunk. Ez arra enged következtetni, hogy a citromsavciklus intenzíven működik a vizsgált emlőcarcinoma-sejtekben, a fibrosarcomasejtben viszont funkciója nem olyan jelentős (3. ábra). Ezek igazolják a HT1080 sejt elsősorban glikolitikus aktivitását és a sejtben nem megfelelően funkcionáló mitokondriális oxidációt, az acetátnak, mint energiaszubsztrátnak a rossz hasznosíthatóságát a HT1080 sejtek számára. Ezek alapján a HT1080 xenograftot hordozó egerekben megfigyelt acetáthasznosítás egyértelműen a gazdaszervezet anyagcseréjében bekövetkezett változásokra utal. Ez jó példa arra, hogy a tumorsejt-populáció (pl. HT1080), amely kismértékben oxidálja az acetátot szövettényészetben (2. ábra), az acetátoxidáció mértékét jelentősen megemelheti a gazdaszervezetben, mint azt vizsgálatainkban a kísérleti egerekben tapasztaltuk (5. táblázat). Ennek a sajátos jelenségnek a megértéséhez azonban mindenképpen további igazoló vizsgálatok szükségesek, amelyek új összefüggéseket tárhatnak fel a daganat és a gazdaszervezet közötti kapcsolat megértésében.

MEGBESZÉLÉS

Tanulmányunk igazolta feltevésünket, miszerint a glükózból és az acetátból felszabaduló CO_2 mennyiségének összehasonlítása ígéretes vizsgálati rendszer, eszköz lehet a tumorsejtek, valamint a tumor gazdaszervezete bioenergetikai mechanizmusának tanulmányozásában, megértésében. A módszer szolgáltatta eredmények megértéséhez ismerni kell az alkalmazott bioenergetikai szubsztrátok átalakulását és sejtbiológiai szerepét. A jelen vizsgálat számára kiválasztott glükóz és acetát a glikolízis, illetve a mitokondriális oxidatív foszforiláció jól ismert energiaforrása, emellett azonban egyéb, egymástól eltérő anyagcsere-útvonalakban

is részt vesznek, például a különböző biopolimerek szintézisében (1. ábra). Ez indokolja, hogy a domináns energetikai mechanizmus – glikolízis versus oxidatív foszforiláció – felismerése csak mindkét energiaforrás oxidációjának összevetésekor tekinthető megbízhatónak.

A daganatok fokozott glükózfelvételének felhasználása (PET/CT alkalmazása) ma már beépült a képalkotó diagnosztikába, azonban ennek a daganatokat fémjelző molekuláris eseménynek (20, 21) a mélyebb funkcionális genetikai és metabolomikai értelmezése és további hasznosítása a klinikai onkológiában még várat magára. Már Warburg közel egy évszázada leírta a tumorok fokozott glükózfelvételét, magas tejsavtartalmát, amelyet a sejtlegzés károsodásának ellensúlyozásával magyarázott. Több évtizedes éles kritika után beigazolódott Warburg aerob glikolízis elmélete, miután megállapították az emelkedett tejsavtermelést a daganatok túlnyomó többségében. Felfedezték a mitokondriális enzimek génmutációjának tumorbiológiai szerepét, továbbá kimutatták az onkogének közreműködését a glükózanyagcsere hibás szabályozásában (1, 22). Mindezek ellenére a tumor metabolikus változásainak számbavétele a humán tumorok jellemzésekor még csak szűk keretek között történik, amelynek egyik oka az alkalmazható vizsgálati módszerek, technikák hiánya.

Az általunk leírt vizsgálatokhoz részben hasonló kísérletek korábban már jelentek meg. Ezekben általában egyféle szubsztrát, jellemzően oxidációját vagy a radioaktív szén más irányú, a sejtben, szervezeten belüli akkumulációját vizsgálták alapvetően a kilégzési tesztekkel összefüggésben (23, 24). Daganatsejtek esetében *in vitro* tenyésztőedényekben próbáltak hasonló, a sejtek anyagcseréjét jellemző izotópos vizsgálatokat végezni (25). Saját vizsgálataink újszerűsége a kivitelezésre, illetve az acetát- és a glükózoxidáció párhuzamos jellemzésének fontosságára hívja fel a figyelmet a sejttenyészetek és a szervezet szintjén végzett anyagcsere-vizsgálatokban.

A bioenergetikai szubsztrátokból felszabaduló CO_2 meghatározása egyfelől költségkímélő, másfelől szorosan kapcsolható az ATP-képződéshez. Aerob körülmények mellett elvileg a glükóz mindegyik szénatomja megjelenhet a CO_2 -ban, azonban a tumorsejt igénye más irányba terelheti a glükózból képződött metabolitokat (2, 3). Ezzel szemben az acetát akár endogén (a zsírok lebontási terméke), akár exogén eredetű, túlnyomóan a citrátkörben metabolizálódik. Két szénatomja mintegy 70–80%-ban jelenhet meg a légzési CO_2 -ban. Ezt alátámasztja a sejtek acetátoxidációja és oxigénfogyasztása közötti összefüggés, ezért lehet az acetátoxidáció mértékéből következtetni a sejtek oxidatív foszforilációjának változásaira, így az ATP termelésére. A fenti szempontok támpontot nyújtanak a bemutatott vizsgálati eredmények értelmezéséhez.

Jelen vizsgálati eredményeinkből arra következtettünk, hogy a vizsgált emberi szolid tumor sejtvonalakat jellemző fokozott glükózoxidáció, ugyan változó mértékben, de a sejtvonalak többségében elérte vagy meghaladta az acetát oxidációját (ez a tumorok többségét szövettanban is jellemző Warburg-effektus alapján nem meglepő). Párhuzamosan azonban az acetát oxidációjának nagymértékű változékonysága jelzésértékű a mitokondriumok eltérő fokú károsodására. Ez összhangban áll a HT1080 fibrosarcoma több, a sejt bioenergetikai jellemzését célzó vizsgálat alapján megállapított mitokondriális károsodásával és a 2. ábrában bemutatott alacsony acetát oxidációjával (magas glükóz/acetát oxidációs hányados).

Érdekességgé tartható és meglepő, hogy a glükóz oxidációja eredményeink szerint a vizsgált különböző humán leukaemiasejtekben a granulocytákénál és a lymphocytákénál alacsonyabb. Ez azért is meglepő, mert alapvetően az aktiválódó, proliferáló lymphoid sejtekre jellemző a glükózfelhasználás preferenciája (26). Feltételezhető, hogy a glükóz a leukaemiasejtekben elsősorban a biopolimerek számára szolgáltató metabolitokat és kevésbé vesz részt a bioenergetikai egyensúly fenntartásában. A kapott eltérések hátterében elképzelhető az is, hogy a primer izolálás és a forrás (periférián található, nem csontvelői sejtek) is szerepet játszik (periférián a sejtek a sejtciklus G1 fázisában blokkoltak, nem proliferálnak). A glükóz csökkent oxidációja a vérképző rendszer malignus sejteiben azonban mindenképpen további vizsgálatokat igényel.

További fontos megfigyelésünk, hogy *per os* adagoláskor a ^{14}C -jelzett acetát, míg intravénás kezeléskor a glükóz oxidációja a nagyobb mértékű. Ez a megfigyelés amellet, hogy rámutat az érintett szervek eltérő szubsztarázhasznosítására, utalást jelenthet például a vizsgált tumor által károsított szervekre (pl. izomzat) is. Hasonló különbségeket a szubsztarátfüggő CO_2 -produkcióban máj- és szívkárosodás eredményeként tapasztaltak korábban rágcslómodellekben is (27). A [^{14}C]-glükóz adagolását követő első és második órában elkülönítve összegyűjtött CO_2 radioaktivitásának meghatározásával jellemezhető a glükózyanyagcsere körforgalma is a szervezetben. A glükózzadagolás módjától és a tumor biológiai hatásától függően megváltozott a szervezetben a glükózoxidáció aránya a vizsgálat 1–60. és a 61–120. perce között. A klinikai onkológiában tapasztalható, hogy a malignus megbetegedések különbözőképpen károsítják a szervezetet, amelynek több magyarázata lehet (daganat lokalizációja stb.), ezért hisztogenezisükben eltérő emberi tumorok azonos lokalizációban történt transzplantálása mellett összehasonlítottuk a tumort hordozó állatok bioenergetikai profilját. A jelen vizsgálatokban meg lehetett figyelni az emberi eredetű tumorok, illetve egértumorok hatását a glükóz és az acetát oxidációjára a SCID egerekben,

illetve nem immundeficiens egerekben. Ugyanazon nagyságú és lokalizációjú tumorok eltérően befolyásolták a *per os* adagolt acetát oxidációját a xenograft modellben. Eredeti megfigyelésnek tartható, hogy a vizsgált tumorok közül az acetát oxidációját legjobban a HT1080 fibrosarcoma fokozta, pedig szövettanban alacsony acetát oxidációt mutatott. Ez arra enged következtetni, hogy egyes tumorok megváltoztatják a gazdaszervezet metabolikus profilját, de nem a sajátjukat ruházzák át. Mindezek alapján a humán tumorok által kiváltott és vizsgálati módszerünkkel kimutatható bioenergetikai változások a tumort hordozó xenograft-, graftmodelleken a tumorprogresszió terminális szakaszában mintegy 30–50%-ban kialakuló cachexia tanulmányozására is ígéretes modellek lehetnek (28, 29).

Összegezve, vizsgálataink alapján a bioenergetikai szubsztarátok, glükóz és acetát oxidációjának összehasonlítása alkalmasnak bizonyulhat a tumorsejtek metabolikus jellemzésén túl a gazdaszervezetben kiváltott anyagcsereváltozások megfigyelésére is. Természetesen az általunk használt módszereknek további vizsgálata és validálása szükséges, pl. felhasználva több lymphoma-, leukaemiasejtvonalat és xenograftmodelljeiket, esetleg további humán leukaemia- és lymphomamintákat vagy különböző altípusú adherens tumorsejtvonalakat és szolid tumorokat, pl. emlőcarcinomákat. Eddigi vizsgálataink azonban alátámasztják, hogy több bioenergetikai szubsztará oxidációjának összehasonlítása elsővonalbeli tájékoztató jellegű módszer lehet a tumorok és a gazdaszervezet metabolikus profiljának vizsgálatában.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozunk Csorba Gézának, Maricának, a Semmelweis Egyetem I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet asszisztensének az *in vitro* szövettanászati munkában és Sztodola Andrásnak az állatkísérletekben nyújtott pótolhatatlan segítségéért. Prof. Dr. Vékey Károlynak és az MTA TTK Tömegspektrometriai Osztály dolgozóinak, illetve Dr. Fekete Sándornak (Szent László Kórház) köszönjük, hogy segítették munkánkat. A munka anyagi támogatását az MTA Izotóp ZRT. GVOP 3.1.1., 2004-05-0175/3.0 pályázata biztosította.

IRODALOM

1. Seyfried TN, Flores RE, Poffl AM, Dominic PD. Cancer as a metabolic disease: implications for novel therapeutics. *Carcinogenesis* 35:515–527, 2014
2. Courtney R, Ngo DC, Malik N, et al. Cancer metabolism and the Warburg effect: the role of HIF-1 and PI3K. *Mol Biol Rep* 42:841–851, 2015
3. Jose C, Bellance N, Rossignol R. Choosing between glycolysis and oxidative phosphorylation: A tumor's dilemma? *Biochim Biophys Acta* 1807:552–561, 2011
4. Dhup S, Dadhich RK, Porporato PE, Sonveaux P. Multiple biological activities of lactic acid in cancer: influences on tumor growth, angiogenesis and metastasis. *Curr Pharm Des* 18:1319–1330, 2012

5. Sonnenschein C, Soto AM. Cancer and the elusive cancer genes. *Med Sci (Paris)* 30:688–692, 2014
6. Sullivan LB, Chandel NS. Mitochondrial metabolism in TCA cycle mutant cancer cells. *Cell Cycle* 13:347–348, 2014
7. Koivunen P, Lee S, Duncan CG, et al. Transformation by the (R)-enantiomer of 2-hydroxyglutarate linked to EGLN activation. *Nature* 483:484–488, 2012
8. Yang M, Soga T, Pollard PJ, Adam J. The emerging role of fumarate as an oncometabolite. *Front Oncol* 2:85, 2012
9. Cornejo KM, Lu M, Yang P, et al. Succinate dehydrogenase B: a new prognostic biomarker in clear cell renal cell carcinoma. *Hum Pathol* 46:820–826, 2015
10. Xu W, Yang H, Liu Y, et al. Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of α -ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell* 19:17–30, 2011
11. Nowicki S, Gottlieb E. Oncometabolites: tailoring our genes. *FEBS J* 282:2796–2805, 2015
12. Morin A, Letouzé E, Gimenez-Roqueplo AP, Favier J. Oncometabolites-driven tumorigenesis: From genetics to targeted therapy. *Int J Cancer* 135:2237–2248, 2014
13. Frezza C, Zheng L, Folger O, et al. Haem oxygenase is synthetically lethal with the tumour suppressor fumarate hydratase. *Nature* 477:225–228, 2011
14. Rosenfeld S. Are the somatic mutation and tissue organization field theories of carcinogenesis incompatible? *Cancer Inform* 12:221–229, 2013
15. Burgio E, Migliore L. Towards a systemic paradigm in carcinogenesis: linking epigenetics and genetics. *Mol Biol Rep* 42:777–790, 2015
16. Bushnell PJ, Evans HL, Palmes ED. Carbon dioxide production by individual mice as an index of behavioral and metabolic activity. *Fundam Appl Toxicol* 5:962–970, 1985
17. Favarger PY, Favarger P. Production of CO_2 in the living mouse immediately after injection of 1- or 2- ^{14}C acetate. *Biochimie* 57:623–628, 1975
18. Slater C, Preston T, Weaver LT. Comparison of accuracy and precision of heart rate calibration methods to estimate total carbon dioxide production during ^{13}C -breath tests. *Eur J Clin Nutr* 60:69–76, 2006
19. Szoboszlai N, Guo X, Ozohanics O, et al. Determination of energy metabolites in cancer cells by porous graphitic carbon liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry for the assessment of energy metabolism. *Anal Chim Acta* 819:108–115, 2014
20. Farwell MD, Pryma DA, Mankoff DA. PET/CT imaging in cancer: current applications and future directions. *Cancer* 120:3433–3445, 2014
21. Schumacher MC, Radecka E, Hellström M, et al. [^{11}C]Acetate positron emission tomography-computed tomography imaging of prostate cancer lymph-node metastases correlated with histopathological findings after extended lymphadenectomy. *Scand J Urol* 49:35–42, 2015
22. Smolková K, Plecítá-Hlavatá L, Bellance N, et al. Waves of gene regulation suppress and then restore oxidative phosphorylation in cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol* 43:950–968, 2011
23. Folch N, Peronnet F, Pean M, et al. Labeled CO_2 production and oxidative vs nonoxidative disposal of labeled carbohydrate administered at rest. *Metabolism* 54:1428–1434, 2005
24. Krieg RC, Liotta LA, Petricoin EF 3rd, Herrmann PC. Trapping radioactive carbon dioxide during cellular metabolic assays under standard culture conditions: description of a unique gas-capturing device. *J Biochem Biophys Methods* 58:119–124, 2004
25. Yang Y, Balcarcel RR. Determination of carbon dioxide production rates for mammalian cells in 24-well plates. *Biotechniques* 36:286–290, 2004
26. Pearce EL, Poffenberger MC, Chang CH, Jones RG. Fueling immunity: insights into metabolism and lymphocyte function. *Science* 342:1242454, 2013
27. Kojima S, Hama Y, Kubodera A. Radiorespirometric study of glucose metabolism in liver-damaged rats. *Eur J Nucl Med* 6:365–369, 1981
28. Esper DH, Harb WA. The cancer cachexia syndrome: a review of metabolic and clinical manifestations. *Nutr Clin Pract* 39:643–653, 2014
29. Chevalier S, Farsijani S. Cancer cachexia and diabetes: similarities in metabolic alterations and possible treatment. *Appl Physiol Nutr Metab* 39:643–653, 2014